

Julio Cesar Kehrwald

**Determinação do Regulon Putativo Zur de *Leptospira*  
*interrogans* sv. Copenhageni**

Trabalho apresentado para o  
cumprimento da disciplina Trabalho de  
Conclusão de Curso II (BIO 7016)  
para a obtenção do título de Licenciado  
em Ciências Biológicas pela  
Universidade Federal de Santa  
Catarina

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ruiz  
Mazzon

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kehrwald, Julio Cesar  
Determinação do regulon putativo Zur em  
Leptospira interrogans sv. Copenhageni L1-130 /  
Julio Cesar Kehrwald ; orientador, Ricardo Ruiz  
Mazzon, 2018.  
69 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Microbiologia. 3.  
Biologia Molecular. 4. Sistema de Captação. 5.  
Regulador Zur. I. Ruiz Mazzon, Ricardo . II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Ciências Biológicas. III. Título.

Este trabalho é dedicado a toda  
minha família, em especial meus  
pais, Ivone e Alvarez.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. Ricardo Ruiz Mazzon pela paciência, mas principalmente por ter permitido a entrada no laboratório, local onde pude vivenciar e aprender diversos mecanismos da biologia molecular que até então me eram obscuros por assim dizer, além de sempre poder me auxiliar em protocolos e experimentos de forma que eu pudesse fazê-los por independência minha e claro ensinamentos estes que sempre lembrarei na minha trajetória profissional.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, aos quais pude dar diversas risadas em momentos os quais todos nós estávamos enlouquecendo, sem falar nas festas de aniversário que pude presenciar no nosso ambiente conjunto que aliviavam todo aquele peso de pressa e desespero.

Agradeço aos meus amigos, todos aqueles que estiveram comigo desde minha entrada na UFSC em 2013, onde trilhamos caminhos difíceis, porem nunca deixando de estar perto quando preciso, deixando de lado aquela “cultura” de veterano e calouro, pois todos nós fomos iguais e dividimos momentos de alegria e tristeza. Graças a todos esses que posso chamar de amigos, não enlouqueci totalmente, pude lembrar-me de me divertir, sair e afirmo que aproveitei ao máximo a universidade. Em especial, dou atenção também aos amigos da turma que entrei 2013.2, os quais foram bem presentes nos últimos semestres da universidade, deixo meu agradecimento especial a Monique, Wilker, Juliano, Luiza e Ana Paula e também aqueles que acabaram saindo da Biologia por eventualidades, mas que sempre serão 13.2.

Agradeço meus pais, Ivone e Alvarez, que se não fossem eles, eu não teria sido a pessoa que sou atualmente e me proporcionado a conquistar a vida acadêmica, assim como também agradeço pelas palavras de carinho, da compreensão e da paciência principalmente.

Agradeço a minha irmã, Patrícia, que considero uma segunda mãe para mim, sempre me aconselhando e me ajudando a enxergar as coisas certas. A sua paciência e seus conselhos me ajudaram muito a superar desafios e problemas nos últimos anos.

Agradeço a minha namorada, Rafaela, por todas as manhãs, tardes e noites ao seu lado nesse final de graduação, graças a isso pude passar por obstáculos acadêmicos e emocionais. Seu companheirismo e amor foram essenciais para eu passar sobre todos os obstáculos da graduação. Por fim agradeço todos os momentos felizes que me ajudaram a relaxar durante a graduação.

Agradeço a banca avaliadora, pela disposição e aceitação do convite para participar.

Agradeço ao CNPq e UFSC pelo incentivo financeiro.

Agradeço ao Laboratório de Protozoologia, ao LdI, ao Laboratório de Microbiologia de Solo, ao LIA e a todos os laboratórios que permitiram o uso de seus equipamentos para o auxílio deste trabalho.

E por fim, agradeço a todos os professores aos quais tive o prazer de ter aula, sejam desde o ensino fundamental até o presente momento no ensino superior, meu muito obrigado pelos ensinamentos.

***“Grandeza em pequenos começos”***

Sir Francis Drake

## RESUMO

Leptospirose é uma zoonose cosmopolita de relevância mundial, e seu agente etiológico é uma bactéria do gênero *Leptospira*, que pertence à ordem Spirochaetales. Hospedeiros definitivos são mamíferos roedores, porém podem também ter essa característica, bovinos e cães. Os seres humanos são hospedeiros acidentais ou secundários devido à contaminação excessiva acarretada por péssimas condições de saneamento básico e enchentes constantes em cidades de países subdesenvolvidos devidas a má infra-estrutura. Atualmente existem poucas informações em relação à virulência desta bactéria e sua regulação quando colocada em situações de estresse ou mesmo dentro do hospedeiro. O zinco é um dos íons metálicos mais importantes para bactérias devido a sua necessidade para funcionamento das proteínas (cofator e/ou estrutural). A via de regulação da captação e estoque desse íon para as bactérias é mediada principalmente por proteínas pertencentes à família de reguladores transcricionais que recebe o nome de Fur (*Ferric Uptake Regulator*). Este trabalho tem como objetivo identificar genes regulados pela proteína Zur (*Zinc Uptake Regulator*) em resposta a disponibilidade a zinco. Existem quatro parálogos não caracterizados ou pouco conhecidos da família Fur presentes no genoma de *Leptospira interrogans* sv. Copenhageni tendo sido identificado neste estudo o provável regulador transcricional Zur e seu respectivo regulon neste microrganismo de estudo. Foram alinhados os quatro parálogos com reguladores Zur já descritos de outras bactérias com o objetivo de definir o melhor candidato para ser o putativo regulador Zur no presente modelo e foram feitas análise *in silico* em busca de genes presentes no genoma da bactéria, que pudessem apresentar uma regulação Zur-dependente, utilizando putativos elementos de sistema de captação do tipo ABC (*ATP-Binding Cassete*) como avaliadores primários da busca. Foram usados três possíveis consensos para o sítio de ligação de Zur nos genes. Os resultados encontrados neste trabalho identificaram genes codificantes para componentes de sistema de captação ABC sem uma função predita apenas quando utilizado o consenso de Zur-Box de Actinobacteria, grupo aparentado as Espiroquetas, ordem que pertence o gênero *Leptospira* spp. Um gene, *pab1703*, codificante para um elemento do sistema ABC, foi escolhido dentre a lista de genes putativamente regulados por Zur, além do Zur, codificado por LIC20147, para terem suas regiões promotoras utilizadas no EMSA (Ensaio de mobilidade eletroforética em gel) para verificar a interação entre a sonda e a proteína putativa Zur.

**Palavras-Chaves:** Regulon Zur. Zinc Uptake Regulator. EMSA. Sistema ABC. Interação DNA-Proteína.



## ABSTRACT

Leptospirosis is a cosmopolitan zoonosis of worldwide relevance and its etiologic agent is a bacterium of the genus *Leptospira*, which belongs to the order Spirochaetales. Definitive hosts are rodent mammals, but they may also have this characteristic, cattle and dogs. Humans are accidental or secondary hosts due to excessive contamination caused by poor sanitation and constant flooding in cities in underdeveloped countries due to poor infrastructure. Currently there is little information regarding the virulence of this bacterium and its regulation when placed in situations of stress or even inside the host. Zinc is one of the most important metal ions for bacteria due to their need for proteins (cofactor and/or structural). The regulation of the uptake and storage of this ion for bacteria is mediated mainly by proteins belonging to the family of transcriptional regulators called Fur (*Ferric Uptake Regulator*). This work aims to identify genes regulated by the Zur protein (*Zinc Uptake Regulator*) in response to zinc availability. There are four uncharacterized or little known paralogs of the Fur family regulators present in the genome of *Leptospira interrogans* sv. Copenhageni having been identified in this study the probable transcriptional regulator Zur and its respective regulon. We aligned the four paralogs with Zur regulators already described from other bacteria in order to define the best candidate to be the putative Zur regulator in the present model and in silico analyzes were performed in search of genes present in the genome that could present Zur-dependent regulation, using putative elements of ABC (*ATP-Binding Cassette*) type uptake systems as primary search evaluators. Three possible consensus for the Zur binding site in the genes were used. The results found in this study identified coding genes for components of ABC uptake system without a predicted function using the consensus of Zur-box of Actinobacteria, a group close related to the Spirochetes order of which it belongs the genus *Leptospira* spp. A *pab1703* gene coding for an ABC system element was chosen from those in the list of genes putatively regulated by Zur, in addition to the putative *zur* itself, encoded by LIC20147, to have their promoter regions used in the EMSA (Electrophoretic Gel Mobility Assay) to verify the interaction between the probe and the putative protein Zur. Initial results showed that there was no binding of purified Zur to the probes in the tested conditions and therefore more studies are needed to elucidate the Zur regulon of *L. interrogans*.

**Keywords:** Regulon Zur. Zinc Uptake Regulator. EMSA. ABC System. DNA-Protein Interaction. Leptospirosis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – do inglês *ATP Binding Cassete*

ADP – Adenosina Difostato

ATP – Adenosina Trifosfato

BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – do inglês *Bovine Serum Albumin*

DMC – do inglês *Dialysis Membrane Chamber*

DNA – ácido Desoxirribonucleico

dATP – desoxiadenosina tri fosfatada

dNTP – desoxinucleotideos tri fosfatados

D.O – densidade ótica

EMSA – do inglês *Eletrophoretic Mobility Shift Assay*

FUR – do inglês *Ferric Uptake Regulator*

His – Referente ao aminoácido histidina (H)

IPTG - isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosideo

l – Litro

LB – do inglês *Lysogeny Broth*

ml – Mililitro

mM – milimolar

ng - nanograma

pb – pares de base

kDa – Quilo Daltons

PCR – do inglês *Polimerase Chain Reaction*

RNA - ácido ribonucleico

RSAT – do inglês *Regulatory Sequence Analysis Tools*

sv. – Serovar/Sorovar

TA – Temperatura ambiente

V - Voltes

$\mu$ l - microlitro

W - Walts

ZUR – do inglês *Zinc Uptake Regulator*

## LISTA DE IMAGENS

Figura 2. Microfotografia de *Leptospira interrogans* tirada em microscopia de contraste de fase. É possível observar o gancho na extremidade da espiroqueta, característica exclusiva do gênero *Leptospira*. Fonte: Picardeau et al., 2009 .....

Figura 3. Vias de contaminação mais comuns de *L. interrogans* para o ser humano. (A) Contato da pele em solo de mata. (B) Lagoas com acesso a esgoto e onde há presença de pratica de banho. (C) Fonte de agua não potável em poço. (D) Uso de agua de poço para atividades domésticas. Fonte: Picardeau et al, 2009.....

Figura 4. Funcionamento do Sistema de captação ABC e a relação entre os domínios NBD e TMD. É possível observar a ligação do ATP nos domínios NBD, a qual acarreta a mudança da conformação da proteína e consequente abertura do poro interno e fechamento do poro externo, pertencentes a proteína transmembrana e que possui os domínios TMD definidos, cujo substrato adentra o meio intracelular, posteriormente ocorre o desligamento de ADP e retorno da conformidade inicial da proteína transmembrana. Fonte: Wilkens, 2015. ....

Figura 5. Esquematização da estrutura quaternária do transportador ABC da maltose, com a maltose no seu sitio catalítico. Definição dos domínios NBD e TMD Fonte: Wilkens, 2015 .....

Figura 6. Esquematização da regulação do sistema de captação de Zinco em alta e baixa concentração do íon no meio intracelular. A linha amarela mostra o sitio de ligação da proteína reguladora transcricional Zur, presença do complexo apo-zur formado em baixa concentração, em alta concentração há a presença dos homodímeros que é a proteína em estado funcional, com o Zinco no seu sítio ativo. Fonte: O autor. ....

Figura 7. Esquematização do funcionamento de um Regulon Zur, rede regulatória simples. Presença da proteína reguladora transcricional Zur com seus sítios de ligação presentes na sequência de aminoácidos anterior a cada operador com genes relacionados a captação de zinco. Fonte: Trost et al., 2010.....

Figura 8. Alinhamento entre os quatro parálogos putativos de Fur de *Leptospira*.....

*interrogans* sv. Copenhageni conhecidos e os reguladores Zur já descritos da família Fur em *Mycobacterium tuberculosis* (GenBank:

P9WN85), *Caulobacter crescentus* (GenBank: 7329708), *Escherichia coli* (GenBank: P0AC51), *Bacillus subtilis* (GenBank Accession Number: P54479), *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Xanthomonas campestris* (GenBank: Q4UWS5) . Nos retângulos vermelho, resíduos conservados. Seta verde indica o melhor candidato escolhido. Obs: Figura foi editada onde foi colocado os retângulos vermelhos nos resíduos escolhidos .....

Figura 9. Estrutura 3D da proteína (monômero) de FurB de *Mycobacterium tuberculosis*. Estrutura modificada no PyMol. Observam-se os resíduos conservados em vermelho, junto com o zinco não estrutural em sitio catalítico. Fonte: Phyre2, modificado no PyMol.....

Figura 10. Predição 3D de LIC20147 baseada na predição de FurB. Resíduos conservados presentes em vermelho, em volta do zinco não estrutural. Observasse a presença de duas histidinas na zona catalítica. Fonte: Phyre2, modificado no PyMol.....

Figura 11. Parentesco filogenético entre Actinobacteria, sublinhado em vermelho, e Spirochaetes, sublinhado em vermelho. Observa-se também a ênfase em *Mycobacterium tuberculosis*, onde já possuía uma Zur-Box conhecida (Cicarrel et al, 2006).....

Figura 12. Teste de indução de expressão da proteína recombinante His-Zur (6x), 17kDa, feito durante três horas com auxílio de IPTG (1mM) em linhagem BL21(DE3) de *E. coli*. Padrão de tamanho molecular (*Precision plus Protein Standards*, BIORAD); indução de 1h (0h – 1h); indução de 2h (0h – 2h).....

Figura 13. Gel de poliacrilamida descorado com Destain. É possível ver a banda da proteína recombinante His-Zur (17 kda) induzida em *E.coli* BL5a(DE3) em meio LB após 3 horas de indução com IPTG em agitador a 37,5°C juntamente com os produtos de cada etapa da purificação como não ligado, sobrenadante, lavagens e eleições (E1, E2, E3, E4). Obs: A imagem teve seu contraste alterado para melhor visualização.....

Figura 14. Resultado do EMSA por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, 8%. Em A, teste com tratamento feito com enzima Trombina, em I e V, presença de apenas a sonda livre de *pab1703*, cujo em V esta a sonda de 125 pb e em I esta a sonda de 231 pb; em II e VI, presença do complexo com as sondas *pab1703* + Proteína Zur. Em B, teste sem o tratamento com a enzima trombina, em II, IV e VI presença

apenas das sondas, respectivamente *zur*, *pab1703* menor e *pab1703*  
maior. Obs; 1) Imagem teve seu contraste alterado.....

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2. Leptospirose.....	3
1.3. Transportadores de Zinco.....	5
1.3.1 Transportadores ABC.....	7
1.3.2 Família FUR.....	10
1.4. Regulon ZUR.....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
4. METODOLOGIA.....	20
4.1 Linhagens e condições de cultivo.....	20
4.2. Análise de genes de <i>L.interrogans</i> sv. Copenhageni L1-130.....	20
4.3. Varredura <i>in silico</i> .....	20
4.4. Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene zur de <i>Leptospira interrogans</i> sv. Copenhageni.....	21
4.4.1 Amplificação e clonagem do gene <i>zur</i> .....	21
4.4.2. Obtenção do DNA plasmidial e digestão das enzimas de restrição.....	21
4.4.3. Preparação dos plasmídeos para clonagem e sequenciamento.....	22
4.5 Expressão e purificação Zur-His(6x).....	22
4.6 Obtenção das sondas para EMSA.....	23
4.7 Ensaio de Alteração de Mobilidade Eletroforética em Gel.....	23
5. RESULTADOS.....	25
5.1 Alinhamentos de parálogos entre outros organismos com <i>Leptospira interrogans</i> sv. Copenhageni.....	25
5.2 Similaridades estruturais entre proteínas com estrutura determinada.....	26



5.3 Sítios de ligação de Zur e Sistema ABC de transporte.....	27
5.4 Indução e purificação da proteína His-Zur.....	30
5.5 EMSA.....	33
6. DISCUSSÃO.....	36
7. PERSPECTIVAS e CONCLUSÃO.....	43
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	45

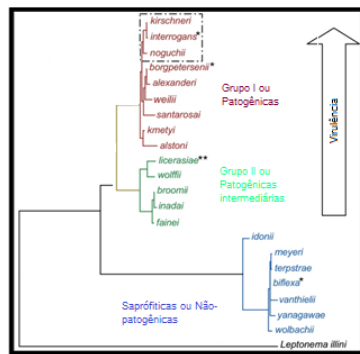


## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Leptospira interrogans*

Das 22 espécies, doze são classificadas como patogênicas causadoras da leptospirose. Dentro do gênero, cada espécie pode ser dividida em subespécie e/ou sorovar, que são associados ao hospedeiro natural e sua resposta imune/humoral (MOHAMMED et al, 2011).

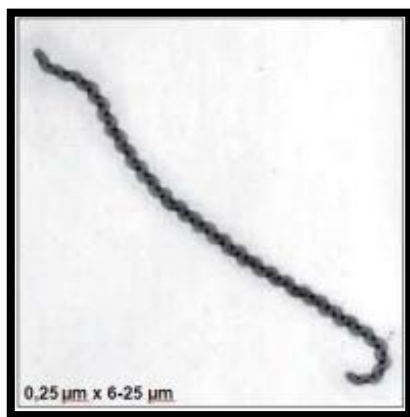
Inicialmente, o gênero foi dividido em dois complexos de acordo com duas espécies, *L.interrogans* e *Leptospira biflexa*. O complexo da *L.interrogans* agrupava todas as patogênicas, enquanto que o complexo da *L.biflexa* agrupava as demais (BHARTI et al, 2003). Os organismos são classificados atualmente em três grupos (Figura 1.), de acordo com seu grau de virulência, hibridação DNA-DNA e análise filogenética de rRNA 16S (LEHMANN et al, 2014). Os três grupos recebem os seguintes nomes: grupo I ou também chamado de patogênicas, grupo II ou patogênicas intermediárias e por fim, o grupo das não patogênicas ou saprófitas (FAINE et al., 1999).



**Figura 1.** Cladograma do gênero *Leptospira*, que separa as 22 espécies nos três grupos definidos de acordo com o grau de virulência. Fonte: Lehmann et al. (2014) modificado.

A bactéria *Leptospira interrogans* (Spirochaetales: Leptospiraceae), descrita em 1907 por Henry L. Stinson, é patogênica em mamíferos, tem como características ser aeróbica e gram-negativa,

evidente no gênero. É uma bactéria móvel, em formato saca-rolhas ou espiral, a qual possui uma diferenciação única do gênero dentro do grupo espiroqueta que são os ganchos localizados em cada extremidade. É extremamente delgada, com cerca de  $0,1\ \mu\text{m}$  de diâmetro e de 6 a  $20\ \mu\text{m}$  de comprimento, o que torna sua visualização ao microscópio possível apenas em microscopia de campo escuro, de contraste de fase ou varredura, entretanto é mais indicada a microscopia de campo escuro para uma visualização ideal (FAINE et al, 1999., BHARTI et al, 2003). *L. interrogans* (Figura 2.) é uma das espécies que possuem um alto grau de virulência dentro do gênero *Leptospira*, e é um dos principais agentes causadores da doença chamada leptospirose em mamíferos.



**Figura 2.** Microfotografia de *Leptospira interrogans* tirada em microscopia de contraste de fase. É possível observar o gancho na extremidade da espiroqueta, característica exclusiva do gênero *Leptospira*. Fonte: Picardeau et al., 2009

O gênero *Leptospira* é considerado de difícil manuseio quando se trata de crescimento em cultura, pois a maioria de suas espécies necessita de meios específicos para seu crescimento e apresentam baixa taxa de multiplicação e metabolismo, demorando entre semanas a meses para atingir uma fase estacionária no crescimento. A espécie *L. interrogans* possui diversos tipos de sorovares, os quais variam entre hospedeiros secundários. Dentre os muitos sorovares descritos e existentes, os mais aparentes devido a incidentes observados no Brasil são os que atingem principalmente equinos, humanos e animais

domésticos: icterohaemorrhagiae, pomona, wolffi, hardjo, canicola, australis, autumnalis, ballum, batavie, grippotyphosa, javanica, panama, pyrogenes, tarassovi, castelloni, hebdomadis, sejrøe, bratislava, butembo e copenhageni. (CORRÊA et al., 1957; FREITAS et al., 1960; BARBOSA, 1962; SANTA ROSA et al., 1968; SILVA et al., 1972; CORDEIRO et al., 1974; TERUYA et al., 1974; JARDIM et al., 1978; GIORGI et al., 1981; ABUCHAIM, 1991; MOLNAR et al., 2001). De acordo com Nascimento e colaboradores (2004), que compararam o sorotipo Copenhageni com o sorotipo Lai, foi observado novas características que auxiliaram na compreensão de características fisiológicas em relação a mecanismos moleculares deste sorotipo pertencente à espécie *L. interrogans*.

## 1.2. Leptospirose

A primeira descrição da doença evidenciada ocorreu em 1886, feita por Adolf Weil por meio de suspeitas sintomatológicas e em 1915, Uhlenhut e Fromme provaram a existência do agente etiológico por meio de visualização microscópica de leptospiros em sangue de soldados com suspeita de leptospirose, que era chamada na época de doença de Weil. A leptospirose é uma zoonose aguda infecciosa que atinge grande parte de mamíferos selvagens devido a sua fácil proliferação por meio da urina e contato com a população, permite a configuração como uma patogenia cosmopolita, onde é capaz de alcançar todas as partes do planeta. Possui uma taxa de incidência maior em países tropicais do que países com clima temperado devido, principalmente, as constantes épocas com altos índices pluviométricos. A transmissão do agente etiológico ocorre de um mamífero para o outro, por contato direto ou indireto com urina infectada ou por meio de veículos contaminados como alimentos, solo ou água (FAINE et al, 1999; LOMAR, et al., 2005). A doença tem como característica a presença de hospedeiros primários os quais são roedores, que inoculam a bactéria e consequentemente servem como reservatório, e os chamados de secundários, que são mamíferos de porte médio/grande como cães, gatos, bovinos, equinos ou humanos, onde a doença pode apresentar sintomas mais agravantes (GOUVEIA et al, 2008).

A transmissão por meio de água contaminada ocorre devido ao contato com urina que possui o agente etiológico. A transmissão entre animais ocorre por meio de qualquer contato com mucosas ou vísceras de animais contaminados, no caso do ser humano ele se infecta por meio

do solo ou água contaminada (Figura 3.), onde nestes houve contato com urina contaminada (AVELAR & PEREIRA, 2005).



**Figura 3.** Vias de contaminação mais comuns de *L. interrogans* para o ser humano. (A) Contato da pele em solo de mata. (B) Lagoas com acesso a esgoto e onde há presença de pratica de banho. (C) Fonte de água não potável em poço. (D) Uso de água de poço para atividades domésticas. Fonte: Picardeau et al, 2009

Inicialmente a doença possui uma fase assintomática, onde ocorre à incubação da leptospira no hospedeiro, logo depois o quadro inicial é inespecífico, pois é caracterizado por sintomas como dor de cabeça, febre e dores musculares, sintomas estes que se assemelham com sintomas de outras doenças. Quando há evolução da doença, os sintomas ficam mais marcantes, evoluindo para uma dor abdominal torácica, meningite asséptica onde já é possível diferencia-la de doenças como dengue, meningites virais e a gripe comum. Em casos graves, é chamada de síndrome de Wells e possui sintomas característicos como insuficiência renal e hepática, miocardite, hemorragia pulmonar que ocasiona estado de óbito ao hospedeiro (GOUVEIA et al, 2008).

Atualmente a leptospirose é mais frequentemente encontrada em nações em desenvolvimento devido à má administração pública que gera

o ambiente ideal de disseminação pela falta de condições em relação ao saneamento básico possibilitando maiores chances do animal portador/disseminador entrar em contato direto com a população. A falta de auxílio as comunidades atingidas acarreta também um maior índice de proliferação, uma vez que muitos indivíduos acabam continuando a contaminar locais acessíveis, impedindo que haja um controle da doença e diminuição da taxa de infecções. Graças a toda essa falta de auxílio por parte dos governos, o numero de casos mundiais só cresce, aumentando consequentemente o numero de óbitos, que acaba gerando um grande problema de saúde publica mundial (LIMA, 2009).

A doença esta ligada também, principalmente, com fatores socioambientais, uma vez que a ocupação desordenada do espaço urbano faz com que ocorra surgimento de ambientes com ausência de saneamento básico como ocorre em favelas ou periferias, chamadas “bolsões da pobreza”. Um dos maiores problemas nessas regiões é a época de enchentes e inundações, pois facilita o contagio e aumenta o índice de contaminação por *Leptospira* já que há contato direto com a urina do rato, transmissor da doença (LIMA, 2009)

No Brasil, é uma doença classificada como endêmica, onde pode se tornar epidêmica em períodos chuvosos. Nos últimos dez anos, houve confirmação de mais de 3.500 casos anuais de leptospirose, onde neste numero, há uma maior incidência de casos confirmados nas regiões sul e sudeste do país. Nesse mesmo período há registro de 375 óbitos anuais que é o mesmo que 10% de mortalidade em casos confirmados (BRASIL, 2015).

As medidas de prevenção e controle da doença, relativa à fonte de infecção são melhorias do saneamento básico e condições de higiene para a população, além de o lixo comunitário possuir um destino adequado mantendo coletas constantes de lixeiros, manutenção de terrenos baldios, limpeza e desinfecção de áreas domiciliares potencialmente contaminadas e controle de pragas no caso de roedores (BRASIL, 2015).

### **1.3. Transportadores de Zinco**

O zinco é o segundo metal mais importante para o metabolismo do microrganismo, ficando atrás apenas do ferro. Este metal é de grande importância devido ao papel catalítico e estrutural relacionado, em sua maioria, com as proteínas de bactérias (POCHERON et al, 2013).

As bactérias apenas possuem o zinco incorporado em menos de 10% de suas proteínas porque ele tem um papel maior no metabolismo

geral celular como glicólise, regulação de pH e biossíntese de aminoácidos (POCHERON et al, 2013). Porém além de um papel metabólico, zinco já foi descrito como importante para a virulência e sobrevivência de alguns microrganismos patogênicos como *Mycobacterium tuberculosis* (MACIAG et al, 2007). Neste trabalho, os autores apontam que *M. tuberculosis* necessita de zinco para promover a infecção e manter-se no hospedeiro.

Por ser um metal intimamente ligado a proteínas, sua biodisponibilidade é muito restrito, uma vez que a maioria dos mamíferos apresenta um mecanismo pelos quais sequestram íons de zinco sistematicamente e localmente para privar o patógeno invasor, o que acarreta em um maior risco de carência nos microrganismos patogênicos quando estes tentam invadir o hospedeiro (DESROSIERS et al, 2010), porém para tentar contornar essas eventualidades, as bactérias possuem três estratégias conhecidas que podem ser usadas como formas de regular a captação do metal em eventos assim: 1) Metalorreguladores sensíveis ao metal, fazendo papel regulatório transcricional; 2) Sistemas de captação de alta afinidade, que são capazes de captar os íons restantes no meio extracelular e leva-los para o meio intracelular bacteriano com auxílio de subunidades acessórias proteicas e 3) Presença de uma reserva de zinco para alocação em enzimas essenciais (WILKENS, 2015; CAPDEVILA et al, 2016).

Apesar de essencial para sua sobrevivência, quando em excesso os íons de zinco tornam-se tóxicos para a célula, uma vez que acaba por inibir a atividade de diversas enzimas ao competir com outros metais cofatores (BLENCOWE & MORBY, 2003). Para lidar com a dualidade destes íons, os organismos devem controlar as concentrações intracelulares do metal por meio de reguladores que atuam nos sistemas de captação. A captação de zinco em procariotos pode ser realizada por diferentes tipos de transportadores localizados nas membranas interna e externa. Um exemplo de sistema de transporte utilizado na captura desse metal são os transportadores do tipo ABC (*ATP-Binding Cassete*) representados pelos elementos ZnuABC de *Escherichia coli* (PATZER & HANKTE, 1998), o Zupt, membro da ZIP, família de transportadores presentes também em eucariotos e considerado de baixa afinidade (HANKTE, 2005) e também receptores dependentes de TonB-ExbB-ExbD como descritos em *Neisseria meningitidis* e *Caulobacter crescentus* (STORK et al, 2010; MAZZON et al, 2014).

O transportador ZnuABC possui três genes que transcrevem para cada componente desse transportador: *znuA*, *znuB* e *znuC*. O gene *znuA* codifica o componente periplasmático para ligação de zinco no



transportador, o gene *znuB* codifica para o componente transmembranar e o gene *znuC* codifica para a ATPase (POCHERON et al, 2013).

ZupT é um dos primeiros transportadores caracterizados da família ZIP e já demonstrou ser captador de zinco em outros organismos, sendo o gene *zupt* (codificante de ZupT) de expressão constitutiva. Esse transportador é, ainda, capaz de transportar outros metais como manganês, ferro, cobalto além do zinco (POCHERON et al, 2013).

A chamada exportação do zinco ou desintoxicação do metal acontece pela ação da ATPase ZntA de tipo P1B e por facilitadores de difusão (ZitB e YiiP, transportadores CDF) os quais catalisam a translocação do metal através da membrana interna e o transporte do substrato. A família CDF de transportadores de zinco é amplamente distribuída, tanto em procariotos quanto em eucariotos. Já foi proposto que ZntA é essencial para sobrevivência de *E. coli* na presença de concentrações elevadas de zinco (POCHERON et al, 2013).

Em contra partida, o ZitB apenas mantém a homeostase de zinco em condições normais de crescimento. No estudo de Wang e colaboradores (2013) a superexpressão de ZitB conferiu aumento significativo na tolerância a zinco em *E. coli*, enquanto que YiiP afetou a resistência ao metal (WANG et al, 2013).

O controle da captação de íons na homeostase de zinco, em diversas bactérias é realizado também pelo regulador transcricional Zur (*Zinc Uptake Regulator*) que pertence à família de proteínas Fur (*Ferric Uptake Regulator*) que auxiliam na repressão ou indução de genes envolvidos na homeostase de outros metais como ferro, manganês e níquel.

Dentre os reguladores transcricionais já descritos de zinco em bactérias, temos o ZntR de *E.coli* (BLOCKLEHURST et al, 1999), CztR de *C.crescentus* (BRAZ et al, 2010) que são reguladores de intrusão do metal, já o regulador de CztA de *Staphylococcus aureus* (KURODA et al, 1999) possui tanto uma regulação de intrusão e extrusão do metal.

### 1.3.1 Transportadores ABC

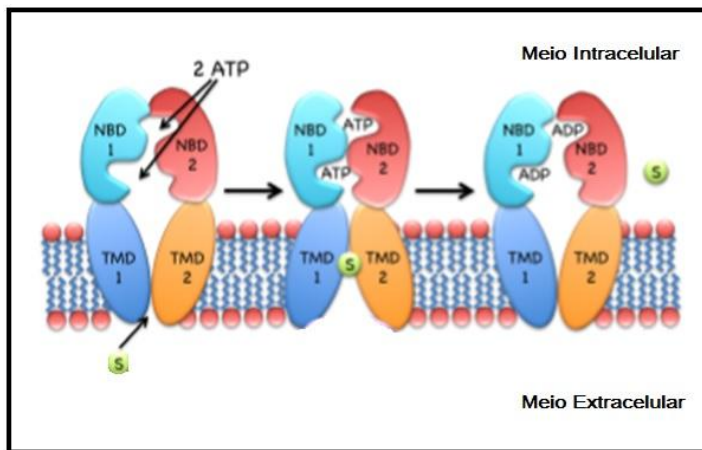
Os transportadores ABC são uma das principais famílias de proteínas de membrana tanto de eucariotos quanto procariotos, pois possuem em sua maioria, domínios semelhantes em seu DNA além de que é uma das famílias de proteínas mais identificadas em genomas (WILKENS, 2015). Isso se deve a uma alta conservação em seu sítio de ligação de ATP e um pequeno consenso, a sequência “LSGGQ” (WILKENS, 2015). Uma das características evidente é estar contra o

gradiente químico, onde são classificados como transportadores primários ou transportadores ATPase, já que possuem uma ATPase que auxilia na hidrólise de ATP e permite que o transporte ocorra, já que necessita de uma fonte de energia para a reação enzimática para que se faça acontecer o transporte. Os transportadores ATPase são considerados uma superfamília que contem diversos transportadores como F-. A-. V-ATPase e principalmente os transportadores ABC (PEDELTEN, 2007). Diferente da maioria das outras famílias de transportadores que possuem uma ATPase e apresentam uma capacidade limitada de captação de substratos, a família ABC consegue envolver um amplo espectro de moléculas inorgânicas e orgânicas, principalmente íons metálicos, em sua captação.

Atualmente 1 a 3% dos genes de procariotos codifica para subunidades de transportadores ABC (KANEHISA, 1998)

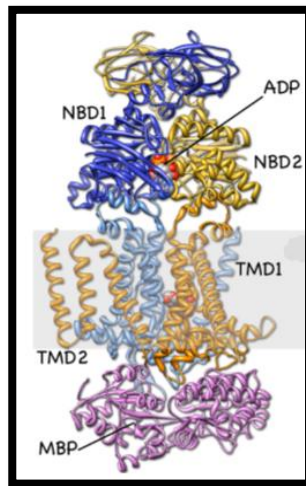
A classificação pode ser dividida apenas em duas classes, os importadores, que são chamados também de tipo I ou II, onde essa subdivisão se deve a fatores de mecanismo e arquitetura proteica, e os exportadores. Apenas procariotos possuem tanto importadores quanto exportadores, enquanto que os eucariotos, tirando exceções específicas, possuem apenas exportadores.

Um transportador ABC possui em sua organização quatro domínios funcionais, dois NBD (NBD1 e NBD2) e dois TMD (TMD1 e TMD2). Esses domínios em procariotos em sua maioria podem estar de diferentes maneiras, pode ser uma combinação de subunidades idênticas, par idêntico ou combinação entre TMD e/ou NBD fundidos (HOLLAND & BLIGHT, 1999). Os domínios NBD e TMD funcionam de forma conjunta. Quando há a ligação de ATP no domínio NBD, ocorre uma dimerização que ocasiona na mudança de conformidade do domínio TMD que faz com que o substrato seja liberado para o meio extracelular já que o transportador fica voltado para o meio externo, para a captação do substrato, para passar posteriormente pela proteína transmembrana presente na bicamada lipídica. Quando ocorre a hidrólise de ATP, ocasiona na reconfiguração do transportador que é volta a permanecer voltado para dentro (WILKENS, 2015).



**Figura 4.** Funcionamento do Sistema de captação ABC e a relação entre os domínios NBD e TMD. É possível observar a ligação do ATP nos domínios NBD, a qual acarreta a mudança da conformação da proteína e consequente abertura do poro interno e fechamento do poro externo, pertencentes a proteína transmembrana e que possui os domínios TMD definidos, cujo substrato adentra o meio intracelular, posteriormente ocorre o desligamento de ADP e retorno da conformidade inicial da proteína transmembrana. Fonte: Wilkens, 2015.

Em procariotos, nos importadores, além dos quatro domínios necessários, é preciso também uma proteína, ou subunidade acessória, que é necessária para capturar o substrato de transporte e direciona-lo ao sítio de ligação da TMD's. Em gram negativas, as proteínas solúveis que fazem esse papel de auxílio no transporte têm aproximadamente 30-50 kDa e são encontradas no periplasma, já em gram positivas essas subunidades acessórias são lipoproteínas ancoradas externamente na membrana plasmática (WILKENS, 2015).



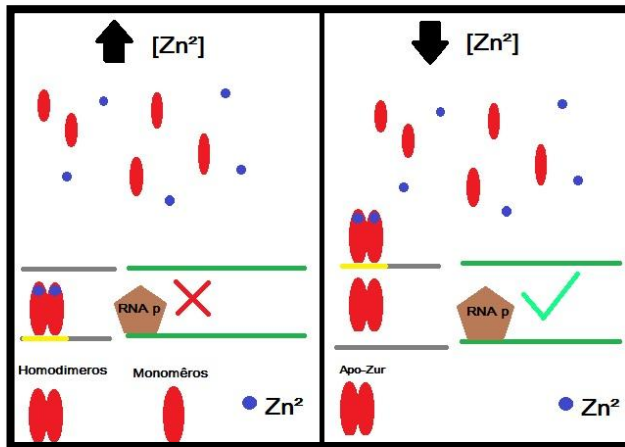
**Figura 5.** Esquematização da estrutura quaternária do transportador ABC da maltose, com a maltose no seu sítio catalítico. Definição dos domínios NBD e TMD Fonte: Wilkens, 2015

O mecanismo dos transportadores ABC é um tanto simples, pois basicamente como todo transporte ativo, eles devem levar o substrato contra um gradiente químico, graças a ação da ATPase que faz a hidrólise de ATP que gera a força motriz. Porém em condições fisiológicas controladas foi visto que com uma bomba efluente de LmrA (fármaco), Balakrishnan e colaboradores (2004) observaram que os domínios de membrana deveriam operar um ou mais “portas” que estão ligadas ao ciclo catalítico do NBD, o que gerava uma troca conformacional, que era conduzida pela ligação do substrato e da hidrólise. Posteriormente a isso, foram propostos diversos modelos do mecanismo dos transportadores ABC, porém não há evidências suficientes para afirmar que todos os transportadores possuem um mesmo mecanismo. Atualmente os transportadores mais bem caracterizados são: Sistema de captação da Maltose – *E.coli* (CHEN, 2013. CHEN & OLDHAM, 2011) para importadores, bombas de resistência de *Staphylococcus aureus* (Sav1866) (DAWSON & LOCHER, 2006) para exportadores.

### 1.3.2 Família FUR

Para muitas bactérias, os metais como ferro, zinco, manganês, não são encontrados disponíveis para serem utilizados, além de que é preciso controlar a regulação de genes de captação, uma vez que em excesso esses metais podem causar toxicação nas bactérias. Em ambiente aeróbicos ou com pH neutro, por exemplo, há metais que estão insolúveis, então o mesmo necessita ser solubilizado para captação. Bactérias patogênicas precisam obter metais essenciais em ácidos orgânicos ou proteínas do hospedeiro. Para essa captação é feito um controle gênico, onde genes são induzidos ou reprimidos para um funcionamento, como é visto em *E.coli* (HANTKE, 1981), onde é induzida a produção de sideróforos para captação de Fe extracelular e logo após ocorre uma repressão quando há um aumento significativo do íon intracelularmente. Esse controle gênico também é visto em relação a outros metais, como zinco, que em *E.coli*, um regulador age em um transportador de alta afinidade em relação a zinco (PATZER; HANTKE, 1998). Isso é ocasionado por um regulador ou repressor Fur, que regula um sistema de captação em bactérias (TROXELL & HASSAN, 2013). O regulador Fur funciona como uma proteína que se liga em sequências específica do DNA bacteriano, onde reprime a transcrição de genes alvos, os quais tem papel na captação do íon metálico. É definido como Fur-Box, Zur-Box, os locais onde a proteína se liga no gene, onde seria o sítio de ligação propriamente dito (LO et al, 2010).

Dentro da família FUR existem diversos reguladores em relação a diferentes metais, como por exemplo, o ZUR, o MUR, o PerR e o NUR onde o que muda em cada um deles é qual metal que é responsável por essa regulação relacionando com genes específicos de cada organismo. Todos eles possuem um sítio de ligação que pode ser denominado Zur – Box, Fur – Box e assim de acordo com cada metal representante.



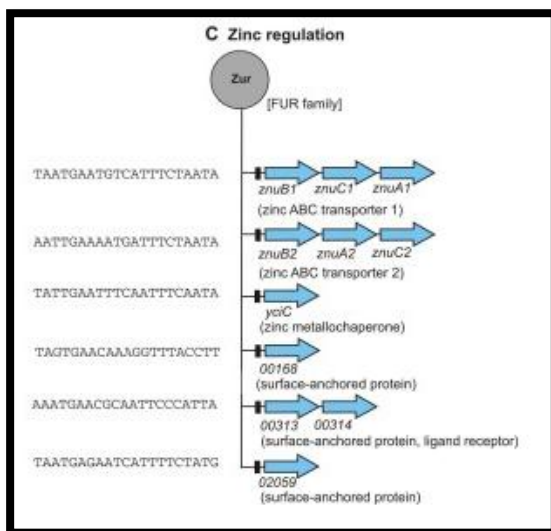
**Figura 6.** Esquemática da regulação do sistema de captação de Zinco em alta e baixa concentração do íon no meio intracelular. A linha amarela mostra o sítio de ligação da proteína reguladora transcricional Zur, presença do complexo apo-zur formado em baixa concentração, em alta concentração há a presença dos homodímeros que é a proteína em estado funcional, com o Zinco no seu sítio ativo. Fonte: O autor.

Inicialmente o funcionamento do regulador depende de alguns fatores, como concentração do metal e presença de monômeros livres do regulador no citoplasma bacteriano, então de acordo com o aumento da concentração do metal respectivo do regulador, há o ligamento dos íons de metal nos monômeros, formando então um dímero que é o regulador com o metal no seu sítio catalítico, que depois de formado se liga no sítio de ligação presente na região promotora dos genes relacionados com a captação do metal e faz o papel de reprimir a transcrição destes genes impedindo a ação da RNA polimerase. Quando há uma diminuição significativa da concentração do zinco, forma-se o complexo Apo-Zur devido a perda do metal e consequente desligamento do regulador da região promotora.

#### 1.4. Regulon ZUR

Dentro da família FUR de proteínas, há a presença de Zur que é o regulador relacionado ao zinco, que é uma metaloproteína que contém um íon de zinco estrutural e catalítico, e atua como repressor de genes

que codificam sistemas de captação de zinco (HANTKE, 2005). Toda sua via repressora ou regulatória é chamada de regulon, que seriam todos os genes que são regulados por esse regulador específico e que possuem uma função relacionada a captação deste metal (figura 7.).



**Figura 7.** Esquematisação do funcionamento de um Regulon Zur, rede regulatória simples. Presença da proteína reguladora transcricional Zur com seus sítios de ligação presentes na sequência de aminoácidos anterior a cada operador com genes relacionados a captação de zinco. Fonte: Trost et al., 2010

Atualmente muitas bactérias já possuem seu regulon Zur descrito, como *Mycobacterium tuberculosis* (MILANO et al, 2004), *Escherichia coli* (HELMANN, 1998) e *Bacillus subtilis* (GABALLA; HELMANN, 1998). Apesar de todos esses regulons descritos, é difícil entender seu funcionamento em relação a possíveis fatores de virulência. O estudo de Helmann (1998) apenas identificou dois operons reprimidos por ZUR, em *E.coli*.

Atualmente não foi descrito e determinado o fator transcricional de Zur em *L.interrogans*, mesmo possuindo diversos estudos que evidenciam a relação do zinco com o microrganismo como no trabalho de Lo e colaboradores. Em estudo utilizando uma abordagem transcriptômica global, Lo e colaboradores (2010) identificaram genes envolvidos na homeostase de ferro que possuem uma associação com os

fatores de virulência da *L.interrogans*, embora ainda pouco se saiba sobre a relação dos íons de ferro com a virulência de *L. interrogans*.

Não foram encontrados estudos relevantes envolvendo o regulon Zur ou mesmo íons de zinco, e seu papel relacionado à virulência, porém o estudo de Yang e colaboradores (2006) demonstra uma possível ligação entre o gene regulado *znuA*, que é um importante gene relacionado ao zinco em microrganismos como *E.coli*, já que o gene é um elemento essencial no sistema de captação da bactéria, e a virulência da bactéria *Brucella abortus* onde foi evidenciado que um mutante de *znuA* no microrganismo “diminuiu” a virulência da bactéria. (YANG et al, 2006).

Há uma grande dificuldade em encontrar artigos com informações para auxílio de pesquisa. O repressor Zur e Zinco são pouco estudados quando se trata de virulência. A família FUR é conhecida pelo sistema de captação de ferro, já que possuem mais informações em relação a virulência de muitos microrganismos. Esse trabalho procura abrir caminhos para futuras pesquisas que escolham essa nova rota, de que zinco e seu repressor estejam relacionados à virulência de microrganismos, como *L.interrogans*.





## 2. JUSTIFICATIVA

Para muitos microrganismos a aquisição de íons metálicos no ambiente ou em hospedeiros infectados é essencial. Estes íons participam de inúmeros processos biológicos compondo metaloproteínas e agindo como cofatores de enzimas, sendo crítica ao microrganismo a obtenção e manutenção dos níveis intracelulares dos mesmos em quantidades adequadas e não tóxicas. Íons como ferro, zinco, manganês e cobre foram descritos como importantes para a virulência de muitas bactérias patogênicas, sendo suas contribuições variáveis mesmo entre espécies proximamente relacionadas.

Apesar dos recentes indícios da importância da homeostase de íons como ferro, zinco e manganês para a sobrevivência e virulência de algumas bactérias patogênicas em relação à *Leptospira interrogans* e outras espiroquetas (como *Treponema denticola* – causadora de periodontites, *Treponema pallidum* *sb. pallidum* – causadora da sífilis e *Brachyspira pilosicoli* – causadora da espiroquetose intestinal em porcos e humanos e até mesmo a própria *Borrelia burgdorferi* – causadora da doença de Lyme) pouco se sabe acerca dos mecanismos regulatórios envolvidos na homeostase de tais metais e da contribuição dos reguladores da família Fur para a patogênese provocada por *L.interrogans*. O estudo da resposta adaptativa à disponibilidade de zinco, bem como a identificação de reguladores transcricionais zinco-responsivos e do próprio regulon Zur podem fornecer informações relevantes para o melhor entendimento da fisiologia desta bactéria e dos processos envolvidos na virulência e patogênese, bem como novos fatores de virulência que, futuramente podem proporcionar o desenvolvimento de metodologias de abordagens propedêuticas vacinais e terapêuticas de maior eficiência. Com este ponto, correlacionado com a pouca informação referindo-se aos processos regulatórios de *Leptospira interrogans* e sua relação com a virulência, é revestido de importância um estudo do regulon presente nesta bactéria em relação à captação do íon mais importante conhecido, o zinco.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Determinação do regulon do fator transcricional Zur da família Fur associado a resposta a disponibilidade de zinco na espiroqueta *Leptospira interrogans* sv. Copenhageni L1-130, agente etiológico da leptospirose.

#### 3.2. Objetivos Específicos

1) Análise do genoma de *L. interrogans* sv. Copenhageni em busca de sistemas de transporte do tipo ABC sem função pré-determinada e que contenham sequências de repetição invertida antecedendo o início de tradução anotado dos genes;

2) Busca *in silico* no genoma de *L. interrogans* sv. Copenhageni por outros genes que contenham a mesma sequência repetida invertida (RI) identificada no passo anterior e que esteja na região a montante dos inícios de tradução destes genes candidatos;

3) Clonagem da ORF LIC\_20147 codificante para o fator transcricional Zur em vetor de expressão e purificação da proteína recombinante Zur-His(6x);

4) Validação dos regulon determinado *in silico* por meio de ensaio de alteração de mobilidade eletroforética em gel (EMSA) utilizando as sondas marcadas com o fluoróforo.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Linhagens e condições de cultivo

O sorovar escolhido para ser utilizado foi o Copenhageni (KO et al., 1999), a cepa escolhida de *L. interrogans* foi L1-130 (BARROCHI et al, 2001). A linhagem de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (HANAHAN, 1983) foi utilizada para procedimentos de clonagem enquanto a linhagem de *E. coli* BL21(DE3) (STUDIER et al., 1990) foi utilizada na expressão e purificação da proteína estudada, Zur (LIC\_20147). As cepas de *E. coli* foram cultivadas em meio LB (Lysogeny Broth) ou 2xTY, suplementados com canamicina (50 $\mu$ g/ml) e ficaram em agitação máxima no agitador a 37°C. Foram feitas placas com meio LB com Agar, para cultivo da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) com o plasmídeo pET28a com a região codificada do gene *zur* para indução, colocadas na estufa 37°C para crescimento.

### 4.2. Análise de genes de *L.interrogans* sv. Copenhageni L1-130

Análise de genes anotados para verificação de funções putativas relacionadas à captação de íons de Zinco de *L.interrogans* sv. Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004) foi realizada por meio da utilização do banco de dados KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*.

### 4.3. Varredura *in silico*

Varredura do genoma de *L.interrogans* sv. Copenhageni foi feita utilizando a plataforma RSAT (Regulatory Sequence Analysis Tools) modulo PATSER (MEDINA-RIVERA et al., 2015) a qual foram buscados genes putivamente regulados pela proteína Zur, cujos sítios de ligação de DNA foram preditos por meio de sequências de outros microrganismos depositados em bancos de dados, ou sequências consenso a partir de sítios de ligação de ZUR já encontrados, como em *Mycobacterium tuberculosis* (MACIAG et al, 2007) além de algumas do grupo das proteobacterias, como *Yersinia pestis* (LI et al, 2009) e em *Caulobacter crescentus* (MAZZON et al, 2014). Foi usado aproximadamente um intervalo de 200 pb do início da tradução dos genes escolhidos.

#### 4.4. Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene *zur* de *Leptospira interrogans* sv. Copenhageni

##### 4.4.1 Amplificação e clonagem do gene *zur*

Utilizando o programa *PrimerQuest Tool* (IDT) foram desenhados iniciadores que foram usados para amplificação da região codificante do gene *zur* com base em buscas *in silico* nas sequências nucleotídicas encontradas no banco de dados GenBank. Os iniciadores *Forward* e *Reverse* contem em suas extremidades 5' sítios de clivagens das enzimas *NdeI* e *EcoRI*, respectivamente, para inserção da correta região do gene no vetor de expressão pET28a posteriormente para produção e purificação da proteína His-Zur.

Amplificação via PCR foi feita por meio de avaliação de sítios de ligação de *Leptospira interrogans*, com a enzima de alta fidelidade High Fidelity DNA polimerase NEB (BioLabs). A solução "Mix" usada para PCR continha dNTP, Taq polimerase High Fidelity, tampão 10x (este já continha MgCl<sub>2</sub> na sua composição) e iniciadores *Forward* e *Reverse* que foram anteriormente desenhados. O produto resultante de amplificação da PCR foi clonado no vetor pGEM T-Easy PROMEGA™. O amplicon foi purificado com o kit *pure field* PROMEGA™ para retirar qualquer resíduo da PCR (dNTP's livres, polimerases e sais). Os amplicons purificados foram submetidos a incorporação do nucleotídeo adenina sobressalente na extremidade 3' por meio de incubação com a Taq DNA polimerase comum e dATP a 72°C por 30 minutos. O produto resultante foi clonado no pGEM T-Easy PROMEGA™. Os fragmentos inseridos no plasmídeo foram submetidos a sequenciamento a fim de confirmar a integridade da sequência do gene (SANGER et al, 1977). O vetor pGEM+*zur* foi introduzido por eletroporação na linhagem de DH5α (*E.coli*) a 1,8 kV, 200Ω e 25μF. A seleção de clones recombinantes foi confirmada por meio de PCR usando os mesmos componentes que foram anteriormente usados na amplificação no DNA genômico do gene *zur*, para confirmação do inserto.

##### 4.4.2. Obtenção do DNA plasmidial e digestão das enzimas de restrição

Os clones da linhagem DH5α de *E.coli* cujos vetores apresentaram o gene *zur* inseridos foram extraídos fazendo o uso do kit cellco™ *Fast-n-Easy* seguindo especificações do fabricante. Também

foi extraído o plasmídeo de expressão pET28a+*zur* contido na linhagem DH5 $\alpha$ . A extração se deu por meio de protocolo de lisa alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Foi feita a digestão do plasmídeo pET28a+*zur* usando as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI* para confirmação do enxerto e posterior uso em eletroporação

**4.4.3.** Preparação dos plasmídeos para clonagem e sequenciamento.

Vetor pET28a vazio e o plasmídeo pGEM® contendo o inserto do gene *zur* foram submetidos a digestão com enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI* (THERMO scientific). A digestão foi realizada com a enzima *NdeI* por 4 horas, a 37°C e, em seguida, a enzima de restrição *EcoRI* foi adicionada e a reação foi mantida por mais 1 hora, a 37°C. O plasmídeo pET28a digerido com as duas enzimas por 20 min, 80°C para desnaturação das enzimas de restrição utilizada. A digestão do pGEM carregando o gene *zur* foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose, 1%, 1x TBE, para recuperação das bandas de interesse referente ao gene *zur* para posterior sequenciamento dos genes e clonagem no vetor pET28a linearizado. Os clones de DH5 $\alpha$  carregando o plasmídeo com inserto tiveram o mesmo extraído por meio do kit cellico™ *Fast-n-Easy* e estas construções foram inseridas por eletroporação na linhagem BL21 (DE3) de *E.coli* para posterior indução via IPTG e expressão da proteína recombinante His-Zur.

#### 4.5 Expressão e purificação Zur-His(6x)

Clones de *E. coli* BL21(DE3) contendo a construção pET28a+*zur* foram inoculados em 300ml de meio LB (Lysogeny Broth) suplementado com canamicina. A indução foi feita por três horas, em agitação, a 37°C para expressão da proteína de fusão His-Zur. Nas duas últimas horas foram colocados 1mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo) para posterior expressão da proteína recombinante His-Zur. Em seguida foi realizada uma eletroforese em gel 12% de poliacrilamida desnaturante em sistema descontínuo de pH SDS-PAGE (LAEMLI, 1970) por 1 hora, 150V. A proteína recombinante induzida foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de níquel Ni-NTA (GibcoBRL), como descrito pelo fabricante. Posterior a purificação da His-Zur, foi feita a quantificação da proteína com o uso de uma curva padrão para definir a concentração aproximada



da proteína recombinante. Para isso foi usada uma Curva padrão BSA, onde media a concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) pela D.O (Densidade ótica).

#### 4.6 Obtenção das sondas para EMSA

As sondas das regiões promotoras de genes candidatos a terem Zur box foram obtidas por meio de PCR nas seguintes condições, na fase de desnaturação foi deixado a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, na etapa de hibridização foram feitos 35 ciclos com etapas de  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e  $72^{\circ}\text{C}$  por 20 segundos e na etapa final, de polimerização, foi deixada por 7 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . Nesta PCR das sondas, foram utilizados iniciadores sintetizados com o fluoroforo FAM (Fluoresceína) ligado a extremidade 5'. Foram realizadas eletroforeses em gel de agarose 1,5%, por 30 minutos a 100V, para visualização e então feita a purificação com o NEW ENGLAND *BioLabs*inc Monarch PCR & DNA Cleanup Kit para utilização posterior.

#### 4.7 Ensaio de Alteração de Mobilidade Eletroforética em Gel

Após a obtenção da proteína purificada e das sondas marcadas foi feito o ensaio de alteração de mobilidade eletroforética em gel – EMSA (AUSUBEL et al., 1992). A proteína His-Zur purificada foi submetida a uma interação com as sondas por 30min a  $20^{\circ}\text{C}$ . Foi utilizada uma reação de ligação aos fragmentos fluorescentes e amostras contendo a proteína purificada (a concentração de proteína usado foi de 45 nM), foi usada uma solução de esperma de salmão assim como um tampão de interação. Em contra partida havia amostras contendo apenas as sondas dos candidatos selecionados sem proteína His-Zur purificada para ter um controle negativo. O material foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, por 5 horas, a 10mA, como descrito por MAZZON e colaboradores (2014) para visualização.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Alinhamentos de parálogos entre outros organismos com *Leptospira interrogans* sv. Copenhageni

O alinhamento entre parálogos da família Fur e reguladores Zur já descritos de outros microorganismos, os quais foram *Caulobacter crescentus* (MAZZON et al, 2014), *Mycobacterium tuberculosis* (MACIAG et al, 2007), *Yersinia pestis* (LI Y et al, 2009), *Escherichia coli* (PATZER; HANTKE, 1998), *Bacillus subtilis* (GABALLA; HELMANN, 1998), *Xanthomonas campestris* (TANG et al, 2005) e *Pseudomonas aeruginosa* (ELLISON et al, 2013) foi feito junto com os quatro parálogos putativos de Fur (LIC20147, LIC11006, LIC11158, LIC12034) definidos em Nascimento e colaboradores (2004) e foi procurado por resíduos de Aspartato (D), Glutamato (E), Histidina (H) ou Cisteína (C) (Figura 5. A e B). Resultado definiu que o melhor candidato entre os quatro parálogos mencionados seria o LIC20147, o qual não possuía uma função descrita.

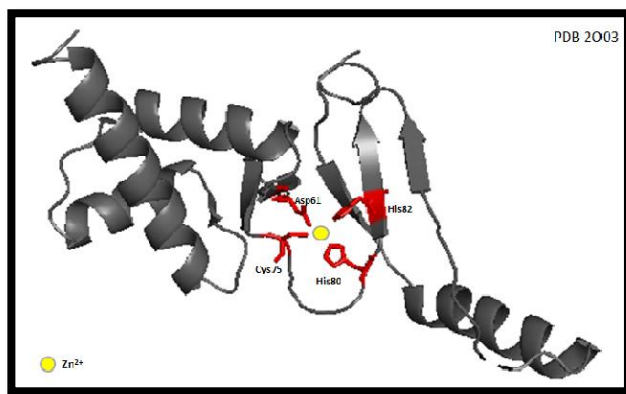


**Figura 8.** Alinhamento entre os quatro parálogos putativos de Fur de *Leptospira interrogans* sv. Copenhageni conhecidos e os reguladores Zur já descritos da família Fur em *Mycobacterium tuberculosis* (GenBank: P9WN85), *Caulobacter crescentus* (GenBank: 7329708), *Escherichia coli* (GenBank: P0AC51), *Bacillus subtilis* (GenBank Accession Number: P54479), *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Xanthomonas campestris* (GenBank: Q4UWS5). Nos retângulos vermelho, resíduos conservados. Seta verde indica o melhor candidato

escolhido. Obs: Figura foi editada onde foi colocado os retângulos vermelhos nos resíduos escolhidos

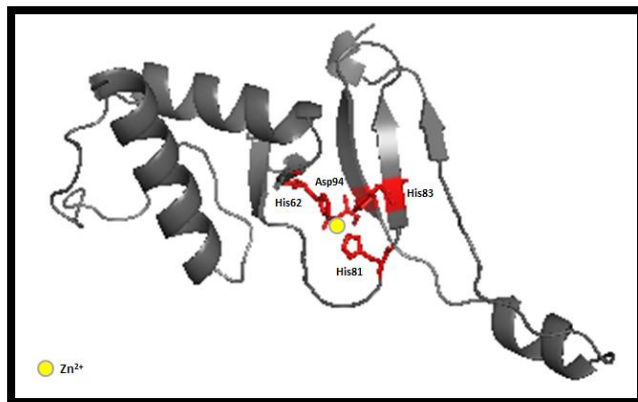
## 5.2 Similaridades estruturais entre proteínas com estrutura determinada

Com o auxílio do programa Phyre2, foi feita a análise da sequência de aminoácidos do candidato escolhido anteriormente pela análise de alinhamentos, LIC20147, usando um banco de dados com proteínas 3D com uma estrutura pré-determinada. O resultado deu uma semelhança aparente com a proteína FurB (Zur) de *M.tuberculosis* (Figura 6) onde possuía 93,8% de cobertura, 29% de identidade e 99,96% de confiança, ou seja, probabilidade de serem homologas.



**Figura 9.** Estrutura 3D da proteína (monômero) de FurB de *Mycobacterium tuberculosis*. Estrutura modificada no PyMol. Observam-se os resíduos conservados em vermelho, junto com o zinco não estrutural em sitio catalítico. Fonte: Lucarelli et al., 2007

Ocorreu então a obtenção de um modelo 3D predito para LIC20147 com base na estrutura de FurB pelo programa BioZentrum Swiss-Model (Figura 7.)



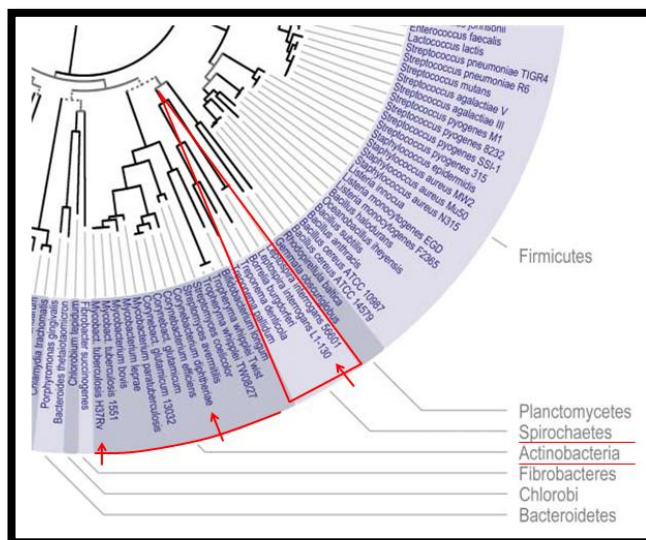
**Figura 10.** Predição 3D de LIC20147 baseada na predição de FurB. Resíduos conservados presentes em vermelho, em volta do zinco não estrutural. Observe a presença de duas histidinas na zona catalítica. Fonte: Phyre2, modificado no PyMol

Foi possível observar a mesma similaridade no arranjo proteico, assim como semelhança no seu sítio catalítico de  $Zn^2$ , porém há a presença de duas histidinas invés de apenas uma em relação ao modelo de FurB de *M.tuberculosis*. Por fim, sendo analisada e comparada com a FurB de *M.tuberculosis* foi observado uma confiança e cobertura altas. Próximo passo então foi a definição do provável sítio de ligação de Zur no DNA de *L.interrogans*.

### 5.3 Sítios de ligação de Zur e Sistema ABC de transporte

Na busca por sítios de ligação de Zur, em análise in silico, foi encontrada inicialmente uma sequência consenso que se caracterizada por repetições invertidas. Foi usado inicialmente o sítio de ligação de proteobactérias, que possuíam diversos reguladores caracterizados e regulons conhecidos como em *C.crescentus*, *Xanthomonas campestris* e *Yersinia pestis*. Então foi feita a análise em banco de dados do RSAT usando o sítio de ligação de proteobactérias (5'TGTTANNNNTAACA3') no genoma de *L.interrogans*, porém esta análise deu como resultado nenhum sistema de captação, definido ou pouco caracterizado, além de várias proteínas hipotéticas encontradas. Assim foi descartado o uso do sítio de ligação das Proteobactérias. Com esse resultado, foi usado o sítio de ligação observado em

Actinobacterias, grupo irmão de Spirochaetes (Figura 8.), que possuía um sitio de ligação de Zur já definido (5'TGAAAATNATTTTCA3') e juntamente com o sitio de ligação já descrito de Zur de *Bacillus subtilis* (5'TCGTAATNATTACGA3') foi feita uma sequência consenso (5'TNNNAATNATTNNA3') onde fui procurado em ambas às sequências por genes candidatos que poderiam ser putativamente regulados pelo candidato Zur de *L.interrogans*. Então foi feita novamente a análise por meio do RSAT em genes de *L.interrogans* e nesta análise por sua vez, saíram 82 genes, onde havia a presença de componentes do sistema ABC, diversas proteínas hipotéticas e não havia genes com relação à homeostase de Ferro ou com sua captação exclusiva.



**Figura 11.** Parentesco filogenético entre Actinobacteria, sublinhado em vermelho, e Spirochaetes, sublinhado em vermelho. Observa-se também a ênfase em *Mycobacterium tuberculosis*, onde já possuía uma Zur-Box conhecida (Cicarrelli et al, 2006).

De acordo com a análise usando o consenso tirado da Zur-Box de Actinobacteria e de *B.subtilis*, por meio de análise *in silico* no KEGG, foi observada a presença de um sistema de captação do tipo ABC nos genes encontrados. Com base na presença deste sistema de captação, foi feita então uma busca, usando este consenso de sitio de ligação, nos

genes de *L.interrogans* por sistemas ABC de transporte para encontrar um bom repórter de condição para o posterior EMSA. Na busca foram encontrados exatamente 50 genes, porém apenas 12 genes (Tabela 1) foram ao final devido a condições como presença de elementos do sistema ABC e genes relacionados ao sistema.

Gene	Função/Classificação
LIC10351	Proteína de Ligação de ATP - Transportador ABC tipo dois.
LIC10538	Proteína de Ligação de ATP - Transportador ABC
LIC10948	Proteína de Ligação de ATP - Transportador ABC
LIC11080	Proteína de membrana integral -Transportador ABC tipo 2 (Sistema putativo permease)
LIC11220	Proteína não caracterizada - Transportador ABC (Permease)
LIC11434	Proteína de Ligação de ATP - Transportador ABC (Ligação do tipo cassette, subfamília F, uup)
LIC12079	Proteína de Ligação de ATP - Transportador ABC (Sistema de transporte complexo de ferro)
LIC12526	Proteína de Ligação de ATP - Transportador ABC (Transporte de sulfato)
LIC12527	Proteína permease - Transportador ABC (Transporte de sulfato)
LIC12528	Proteína permease - Transportador ABC (Transporte de sulfato)
LIC12529	Proteína de Ligação de Sulfato periplasmático - Transportador ABC (Transporte de sulfato, ligação de substrato)
LIC13431	Proteína de Ligação de ATP - Transportador ABC tipo 2 (Sistema de transporte de ATP)

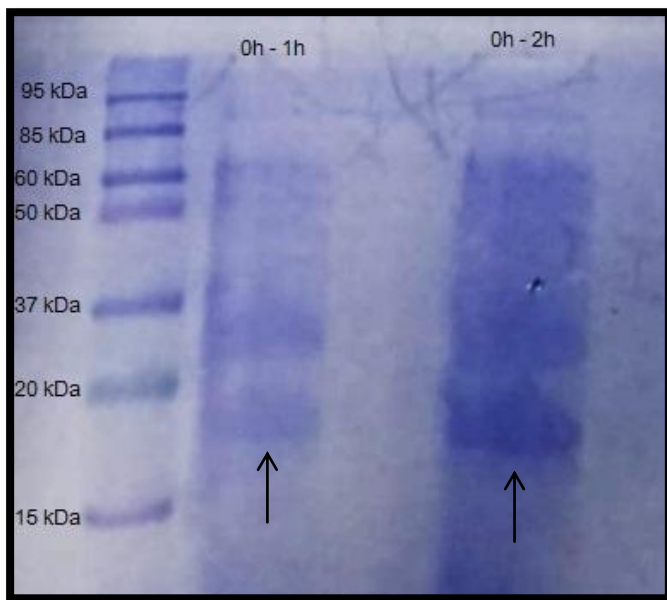
**Tabela 1.** Lista de todos os genes candidatos de *L.interrogans* que possuem a sequência consenso com apenas um espaçamento (5'TNNNAATNATTNNA3') sem nenhuma substituição permitida e que possuem algum componente do sistema de captação da família ABC ou algum gene relacionado ao sistema.

Dos 12 componentes, foi feita uma seleção se baseando na sequência consenso da Zur-box encontrada anteriormente em Actinobacterias e *B.subtilis*, eliminando um total de 11 componentes, sobrando apenas 1 que então foi desenhado oligos para fabricação das sondas. O componente que foi escolhido foi apenas o Pab1703 (LIC13431-435), porem ele possuía duas Zur-Box putativas semelhantes a sequência consenso (5'TTGAAAAATTAATTCTCTA3'/5'TTGTTAATTATTGCTA3').

#### 5.4 Indução e purificação da proteína His-Zur

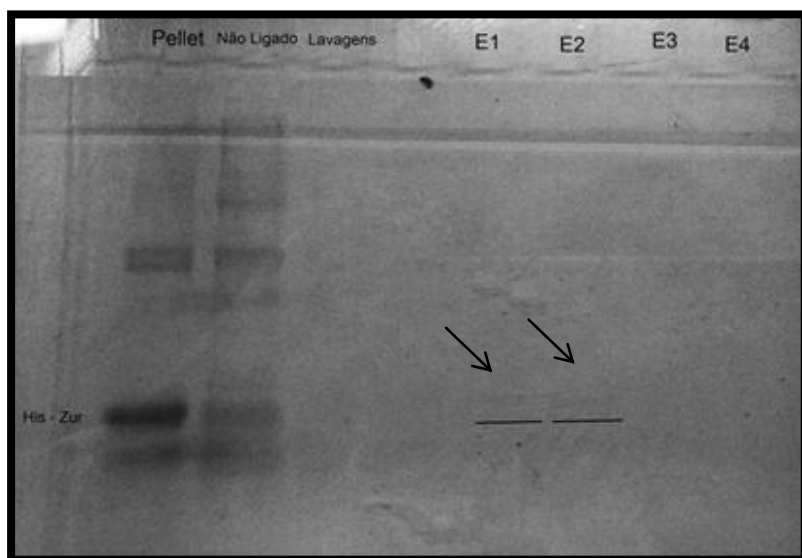
Foi feita a indução da proteína His-Zur para ser usada no Ensaio de alteração de mobilidade eletroforética em gel para obter o nível de amplificação das sondas em relação à proteína de recombinante. Inicialmente foi feita a digestão para obter o fragmento do gene *zur* que estava inserido no vetor pGEM *T-Easy* *PROMEGA*™.





**Figura 12.** Teste de indução de expressão da proteína recombinante His-Zur (6x), 17kDa, feito durante três horas com auxílio de IPTG (1mM) em linhagem BL21(DE3) de *E. coli*. Padrão de tamanho molecular (*Precision plus Protein Standards, BIORAD*); indução de 1h (0h – 1h); indução de 2h (0h – 2h).

Foi utilizado um gradiente de temperatura entre 56°C e 58° para ocorrer aparecimento de apenas uma banda, com o tamanho desejado de 400 pb para o gene *zur* e evitar algum pareamento inespecífico. Na etapa posterior, foi feita a inoculação em *E.coli* da linhagem BL21(DE3) do plasmídeo de expressão contendo o inserto *zur* (pET28a+*zur*). Com o plasmídeo inoculado na linhagem de *E.coli*, foi feita a indução durante três horas com o auxílio de IPTG onde o resultado foi confirmado por meio de PCR em gel de poliacrilamida que colocava a indução com três divisões (0h-1h, 0h-2h, 0h-3h) (Figura 12). Foi usada espectrofotometria para avaliar, por meio de D.O., a colônia induzida para purificação. Posteriormente foi feita a purificação da proteína e confirmação via eletroforese com gel de poliacrilamida 8% a confirmação do produto purificado (Figura 13).



**Figura 13.** Gel de poliacrilamida descorado com Destain. É possível ver a banda da proteína recombinante His-Zur (17 kda) induzida em *E.coli* BL5 $\alpha$ (DE3) em meio LB após 3 horas de indução com IPTG em agitador a 37,5°C juntamente com os produtos de cada etapa da purificação como não ligado, sobrenadante, lavagens e eleições (E1, E2, E3, E4). Obs: A imagem teve seu contraste alterado para melhor visualização.

Foi feita a quantificação para precisar a concentração da proteína recombinante pela densidade ótica. Para definir qual era a quantidade aproximada de proteína na solução total (aproximadamente 1 ml) foi feita uma análise usando uma Cursa padrão BSA, onde media a concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) pela D.O (Densidade ótica).

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Densidade Ótica (D.O)
1,0	0,059
2,5	0,100
5,0	0,268
7,5	0,514
10,0	0,611

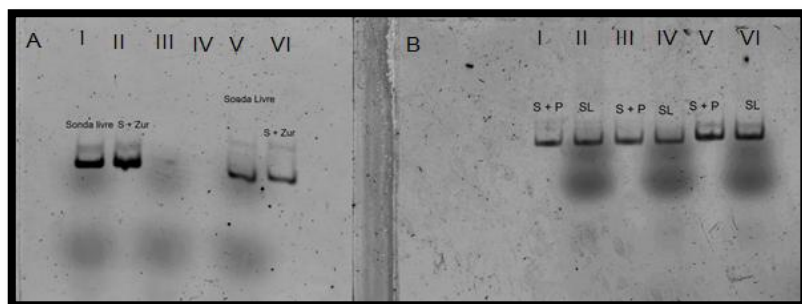
**Tabela 2.** Valores de concentração por D.O usados na formação da curva padrão BSA.

Na confecção da curva, foi obtida a seguinte equação da reta ( $y=0,0665.X - 0,0353$ ) feita no programa Excel™, na qual auxiliou ao resultado da concentração encontrada em cada uma das diluições quantificada. As concentrações encontradas foram de 0,45 ug/ml para a diluição de 10 ul/ml e outra concentração de 1,74 ug/ml para outra diluição de 100 ul/ml. Logo depois de ser feita a curva, foi guardada as diluições para posterior uso no EMSA (Ensaio de alteração de mobilidade eletroforética em gel).

## 5.5 EMSA

Após a confecção das sondas com o Fluoróforo FAM foi feito o Ensaio de motilidade eletroforética em gel como experimento final do trabalho.

O resultado inicial deu como não ligação entre as sondas dos genes *zur*, *pab1703* I e II e a provável proteína reguladora Zur (LIC20147) onde não havia nenhum sinal de complexo DNA – Proteína no gel a primeira vista. Então foi feito mais um Ensaio, porém agora com algumas alterações. Inicialmente alteramos a temperatura de interação de 30°C para 20°C e também fizemos a interação a 4°C, foi feito também soluções novas de tampão de interação (5X) e corrida. Referente ao segundo teste também foi feito um tratamento com enzima de trombina. Como resultado após essas alterações foi a não ligação também entre as sondas *zur*, *pab1703* I e II com a proteína recombinante do candidato a regulador Zur de *L.interrogans*.



**Figura 14.** Resultado do EMSA por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, 8%. Em A, teste com tratamento feito com enzima Trombina, em I e V, presença de apenas a sonda livre de *pab1703*, cujo em V esta a sonda de 125 pb e em I esta a sonda de 231 pb; em II e VI, presença do complexo com as sondas *pab1703* + Proteína Zur. Em B, teste sem o tratamento com a enzima trombina, em II, IV e VI presença apenas das sondas, respectivamente *zur*, *pab1703* menor e *pab1703* maior. Obs; 1) Imagem teve seu contraste alterado.

Vale salientar que o uso do tampão com  $MnCl^2$  e não com Zinco é devido que inicialmente as literaturas usam em sua maioria o tampão com manganês, além de que por não sabermos a concentração ideal de zinco, poderia ser prejudicial a integridade da proteína.



## 6. DISCUSSÃO

O regulador Zur pertencente à família FUR de reguladores tem papel importante na captação de zinco funcionando como repressor transcricional de genes relacionados ao sistema de captação deste metal em diversas bactérias, consideradas patogênicas ou não, como vemos em *E.coli* (HELMANN, 1998, BLOCKLEHURST et al, 1999), *M.tuberculosis* (MILANO et al, 2004) e *B.subtilis* (GABALLA et al, 2002) já descritos em literatura. Em bactérias patogênicas é considerado importante regulador também de fatores de virulência como é mostrado em *Salmonella enterica* (Ammendola et al, 2007). Este trabalho tem o intuito de descrever um regulon putativo de Zur em *Leptospira interrogans* sv. Copenhageni L1-130. Atualmente, relacionando ao organismo do estudo, *L.interrogans*, pouco se sabe sobre a regulação dos genes de captação relacionados a zinco mesmo visto que o metal é essencial para a maioria das bactérias. É possível encontrar apenas genes relacionados à captação de ferro como LA0572 e LA2242, receptores TonB – dependentes, que foram induzidos em resposta a concentração de ferro na bactéria (LO et al, 2010). Por mais que haja estudos em relação aos sistemas de captação de ferro de *L.interrogans* e seus fatores de virulência, nada é considerado concreto, apenas putativo. Para esse trabalho foram inicialmente observados dados de regulação gênica em um hospedeiro mamífero do trabalho de Caimano e colaboradores (2014) a qual realizou comparação de perfis transcricionais entre um cultivo *in vitro* e em DMC (*Dialysis Membrane Chamber*), o qual serviu para simular um cultivo *in vivo*, que há genes não descritos ou pouco caracterizados que são induzidos ou reprimidos, porém ao avaliar os perfis transcricionais não observamos genes diferencialmente expressos que possuísem um claro envolvimento na homeostase de zinco, como por exemplo, o gene *zur*.

Uma vez que não possuíamos nenhum indicativo de genes regulados diretamente por *zur* procedemos com a tentativa de identificação *in silico* de sítios no DNA de ligação do regulador e consequentemente de gene putativamente regulados em resposta a disponibilidade de zinco. Classicamente todos os regulons Zur descritos em bactérias apresentam sistema de captação da família ABC e, portanto a presença de transportadores dessa família norteou nossas buscas *in silico* pelo regulon putativo Zur de *Leptospira interrogans*. Segundo Ammendola e colaboradores (2007) em *Salmonella enterica*, o mutante do gene *znuA* é incapaz de ser virulento para o hospedeiro mamífero mostrando uma relação provável de zinco a virulência da bactéria.

Os quatro parálogos de reguladores da família Fur anotados no genoma de *L.interrogans* (NASCIMENTO, 2004) tiveram suas sequências de aminoácidos alinhadas com sequências de reguladores Zur já descritos em outras bactérias, a qual houve uma busca por resíduos conservados de aspartato, glutamato, histidina ou cisteína indicando a presença de um sítio catalítico de zinco, pois quando não conservados, é um indicativo de possuir um zinco estrutural apenas que seria característica de um provável regulador Fur. O gene LIC20147 se mostrou, dentre os possíveis candidatos selecionados, com mais semelhança devido a presença de resíduos de glutamato e histidina conservados em relação aos demais reguladores alinhados, assim como seu arranjo também se encontrou semelhante em relação à estrutura tridimensional de FurB, o regulador Zur presente em *M.tuberculosis* devido a alta cobertura quando comparado em um banco de dados, o seu sítio catalítico de  $Zn^2$  também mostrou se semelhante mesmo com a presença de três histidinas e um aspartato a qual possivelmente não há interferência na ligação do zinco mesmo com essa composição, já que o sítio catalítico de FurB possui apenas duas histidinas e uma cisteína conservada, também possui uma confiança alta nessa comparação que pode se considerar que haveria uma probabilidade alta das duas proteínas serem homologas devido a presença de resíduos de histidina e aspartato conservados, pois segundo Ma e colaboradores (2009) e Maret e Li (2009) zinco é um metal comumente coordenado pelos resíduos em questão. Com esses dados, pode se corroborar a escolha do candidato por meio de alinhamento de aminoácidos feito anteriormente. A proteína codificada tem 130 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 17 kDa os quais foram definidos por predição *in silico*.

Na tentativa de definição do regulon Zur *in silico* o consenso Zur-Box de proteobactéria foi inicialmente usado, consenso esse que constitui de duas repetições invertidas de alta conservação. Este consenso foi definido com base nos diversos regulons Zur descritos em protobactérias como vemos em *C.crescentus* (MAZZON et al, 2014), *Yersinia pestis* (LI Y et al, 2009) e *Neisseria meningitidis* (STORK et al, 2010). A sequência consenso do sítio de ligação de Zur em proteobactéria (TGTTANNNNTAACA) foi colocado na plataforma RSAT com o intuito de ser comparado no genoma de *L.interrogans* sv. Copenhageni e buscar genes possíveis de serem regulados que possuiriam este sítio de ligação na sua sequência. O resultado foi que nenhum tipo de sistema de captação ou genes relacionados a captação de metais foi encontrada, com isso então o consenso foi descartado e

procurado um novo. Observando a árvore filogenética de Cicarelli e colaboradores (2006), foi visto que o grupo irmão de espiroquetas mais próximo filogeneticamente é o grupo das actinobacteria, grupo ao qual pertence *M.tuberculosis*, cujo regulador foi anteriormente comparado a proteína putativa Zur de *L.interrogans*, o qual seu regulador transcricional havia sido comparado e apresentava forte semelhança com a proteína codificada pelo gene LIC20147. Desta forma usamos o consenso de ligação de Zur de Actinobacteria para a varredura *in silico* no genoma de *L.interrogans* o que resultou em uma lista de genes putativamente regulados por Zur dentre os quais alguns componentes do sistema ABC sem função pré-determinada, mas também genes putativamente regulados por Fur indicando a possibilidade de estarmos utilizando uma sequência consenso de baixa especificidade de ao regulador Zur a levando a obtenção de genes pertencentes ao regulon Fur de maneira concomitante. Então foi feito um consenso entre dois consensos de sítios de ligação de Zur previamente determinados para as Actinobacterias (TGAAAATNATTTTCA) e para *B.subtilis*, esta última usando o sítio de ligação de Zur, já definido do seu regulador (GABALLA et al, 1998) (TCGTAATNATTACGA). Como resultado da busca, foram encontrados 50 genes, porém foi escolhido apenas 12 os quais foram escolhidos de acordo com a presença de componentes do sistema ABC (ATPase, componente periplasmático e componente transmembrana) ainda não caracterizado assim como genes sem nenhum tipo de função definida, porém não relacionados com outros metais. Dentre os 12 genes selecionados dentro dos 50 resultantes da busca usando o sítio consenso de Zur que possuíam sistema de captação ABC não caracterizado, foi escolhido apenas um gene, *pab1703*, onde usando uma análise *in silico* foi possível definir a presença de dois sítios de ligação no gene, sendo que estes sítios eram bem conservados em relação ao sítio consenso escolhido e também quando comparado entre os outros 11 genes escolhidos posteriormente e seus sítios de ligação. Com a escolha e definição tanto do candidato Zur quanto das sondas que seriam usadas no EMSA, foi feita a indução da proteína em *E. coli* da cepa BL21 (DE3). Após a indução, foi feita a purificação com auxílio da resina Ni-NTA devido à presença da cauda de Histidina na nossa proteína recombinante, onde se ligaria na resina funcionando como um selecionador que teria apenas a proteína recombinante His-Zur. Posteriormente foi usada uma membrana de diálise para tirar resíduos de imidazol, que funcionaria como um competidor e poderia comprometer a ligação do DNA com a proteína durante o EMSA. Os resultados do EMSA mostraram que aparentemente não houve ligação da proteína as



sondas, mesmo após o tratamento enzimático com trombina, que serviu para evitar um possível impedimento alostérico de ligação da proteína ao DNA. Foi testado também diferentes temperaturas de interação na tentativa de estabilizar o complexo DNA-Proteína que foi diminuída para 20°C e 4°C, foi usada também uma concentração aproximada de 45 nM fixa e não diversas concentrações como vemos em estudos de *M. tuberculosis* (MACIAG et al, 2007) ou *C. crescentus* (MAZZON et al, 2014) onde tem o objetivo de definir o grau de afinidade, vendo que o presente trabalho foi voltado mais para confirmação da possível interação entre DNA e proteína reguladora. Porém o resultado não se mostrou alterado, o que indica que provavelmente o consenso escolhido para a Zur-Box de *L.interrogans* não era o correto aparentemente. Vale ressaltar que pode ter havido uma ligação, instável, mas para confirmar seria preciso usar uma concentração grande de proteína o que não seria o ideal, vendo que a interação entre DNA e proteína reguladora deve ser relativamente alta como é descrito para outras bactérias como *C. crescentus* ou *N. meningitidis*, esta última tendo uma afinidade grande e possivelmente relacionada à virulência da bactéria, um regulador de alta afinidade que mostraria a interação com uma concentração específica. A não ligação do provável regulador Zur não descarta totalmente que estejamos no caminho certo, pois as análises in silico desse trabalho possuíram dados bem semelhantes em comparação a outros reguladores já descritos, como vemos quando comparada a FurB que possuía uma confiança de 99,96% e principalmente uma cobertura de 93,8% por mais que sua identidade tenha sido de apenas 29%, o que poderia levantar a questão se é suficiente ou não.

Alternativas são necessárias serem observadas, principalmente devido a opção de existir diversas outras técnicas de afinidade entre proteína e DNA como a técnica de imunoprecipitação de cromatina, que é utilizada para identificar uma sequência que pode se ligar a um fator de transcrição. Ela pode ser feita usando um sequenciamento de alto rendimento, onde nesse caso é chamado ChIP-Seq, ou quando usada em conjunto a microarranjos, a qual recebe o nome de ChIP-on-chip, neste caso seria a alternativa a ser considerada, principalmente pois já foi usada para identificar alvos de ligação pertencentes ao regulon Zur de *B. subtilis* e auxílio na compreensão do *Motif* Zur-Box da mesma bactéria (PRESTEL; NOIROT; AUGER, 2015). Neste trabalho de Prestel, Noirot e Auger (2015), foi procurado uma forma de medir os perfis de ligação ao DNA em relação a proteína Zur. Então para isso, depois de extraído e sonificado, o DNA da bactéria do estudo foi purificado com auxílio de um anticorpo, que teria o papel de funcionar como um

marcador para demarcar as regiões do DNA que seriam prováveis sítios de ligação da proteína ZurSPA, para então obter o DNA imunoprecipitado. Foi usado esse DNA com um extrato de DNA inteiro da célula controle, marcado com Cy3 e Cy5 respectivamente, para uma co-hibridização por meio de Microarray. Com esse teste, eles puderam elucidar os perfis de ligação, os *Motif's*, que a proteína reguladora da bactéria se acoplava, pois em análise decorrente aos resultados deste teste, eles observaram picos que seriam os locais de ligação e então escolheram sondas que poderiam ser usadas com possíveis Zur-Box's de acordo com as especificações definidas. A outra opção viável de utilização seria um teste semelhante ao ChIP-on-chip, que seria o chamado ChIP-seq. Esta opção tem como principal vantagem e diferença, o fator de usar o sequenciamento como estratégia de definição de sítios de ligação da proteína específica no DNA, no qual o presumível complexo sofre uma imunoprecipitação por um anticorpo específico, processo semelhante ao ChIP-on-chip, que também passa por processos de precipitação e purificação para depois então ser sequenciado. Esse teste auxilia a ter uma análise completa em todo o genoma, no qual é possível explicar qualquer interação entre proteína e uma região específica do genoma do organismo que for estudado.

Um fator também há ser considerado seria a procura por receptores dependentes de TonB, visto que em algumas bactérias como *C. crescentus* e *N. meningitis* foram encontrados estes receptores sendo regulados por Zur e caracterizados como sistemas de captação de zinco (STORK et al, 2010; MAZZON et al, 2014). Estas proteínas estão presentes na membrana extracelular bacteriana e auxilia no transporte de metais captados, por sideróforos ou por proteínas acessórias, no meio extracelular. Então como a aquisição de metal, principalmente zinco, é essencial para a bactéria, a expressão destes receptores pode depender de reguladores dependentes de metal, assim como também depender de pequenos RNA's e Riboswich (NOINAJ et al, 2010). Também ocorreram análises transcriptômicas e proteômicas que identificaram receptores TonB regulados por Zur, em resposta a zinco, porém não apresentaram um papel na captação de zinco (PAWLIK et al, 2012; HUANG et al, 2008; STORK et al, 2010). Assim como o sistema de captação ABC possui uma função importante na captação de metais em um cenário de depleção de íons metálicos, os receptores dependentes de TonB também possuem uma relevância grande em situações assim (SCHAUER et al, 2008), entretanto estudos apontam apenas o ferro como um metal captado até então, há trabalhos que apontam essa relação com o zinco, porém são ralos de informação relacionada, sendo

superficiais (STORK et al, 2010). É importante ponderar também a procura de possíveis genes que codifiquem proteínas ribossômicas já que em algumas bactérias como *M. tuberculosis*, *B. subtilis*, *X. campestris* e *N. meningitis* foram apontadas que proteínas ribossômicas presentes nestes organismos tem papel de reserva de zinco (GABALLA et al, 2002; MACIAG et al, 2007; PAWLIK et al, 2012; HUANG et al, 2008). Estas proteínas podem estar sendo codificadas por genes que respondem a Zur mesmo não possuindo zinco, mas um sítio de ligação para o regulador. Esta característica estaria presente devido à análise feita por Gabriel e Helmann (2009) que definiu a importância da proteína L31 para o armazenamento e mobilização de zinco, visto que células sem essa proteína tem sua atividade de crescimento diminuída. É suspeita que a proteína tenha atividade ribossômica, logo ela poderia ser considerada uma proteína de dupla função já que isso foi confirmado em trabalhos (WARNER; MCINTOSH, 2009). A relação da proteína L31 com função extra ribossômica em conjunto com regulação por Zur implica em evidências de uma possível adaptação generalizada de bactérias a condições de limitação do metal zinco (GABRIEL; HELMANN, 2009).

Considerando todas as alternativas viáveis em relação a regulação de zinco encontradas em estudo, seria necessário fazer uma nova procura por possíveis genes, que teriam receptores TonB ou mesmo que pudessem ser parálogos em relação aos genes dos receptores propostos em outras bactérias, em *L.interrogans* sv. Copenhageni L1-130, como também genes que codificam para proteínas ribossômicas, os quais poderiam acabar sendo regulados por Zur, pertencendo ao regulon aparente.

É importante também fazer novas buscas *in silico* por novos sítios de ligação em *L.interrogans* sv. Copenhageni L1-130 usando outros consensos ou mesmo testando o consenso usado neste trabalho, porém com mais espaçamentos na sequência e procurando por novos genes putativamente reguláveis que não possuam uma função predita porem seja componentes putativos do sistema ABC de captação, para que sejam usados em futuros experimentos.



## 8. PERSPECTIVAS e CONCLUSÃO

Com base nos testes feitos, com diferentes métodos, foi observado que o consenso Zur utilizado, do grupo das Actinobacterias, como putativo sitio de ligação Zur em *L. interrogans* se mostrou não compatível com o candidato do regulador transcricional Zur, LIC20147, um dos parálogos de Fur determinados (NASCIMENTO et al., 2004). Por meio de EMSA, os resultados mostraram que não houve uma ligação ou uma aparente afinidade entre o candidato e as sondas escolhidas.

A realização deste trabalho com *L. interrogans* sv. Copenhageni mostrou que ainda se tem muito que estudar, pesquisar e compreender a respeito do regulon Zur desta bactéria. Nesse contexto, um passo importante será realizar novas buscas *in silico* no genoma de *L. interrogans* sv. Copenhageni na procura por possíveis genes relacionados a receptores dependentes de TonB e proteínas ribossômicas devido a publicações que caracterizam a regulação destas proteínas por reguladores Zur e sua importância na homeostase de zinco em microrganismos (MAZZON et al, 2014; PAWLIK et al, 2012) . Vale ressaltar também a procura por novos consensos para putativos sítios de ligação de Zur.

Métodos alternativos de detecção de afinidade proteína – DNA como imunoprecipitação de cromatina com auxilio de microarranjos, chamado ChIP-on-chip, ou com auxilio de sequenciamento de alta definição, ChIP-seq, deverão ser considerados em novos testes com a proteína putativa Zur e seus prováveis genes Zur-dependentes.



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABUCHAIM, D. M. Presença de aglutininas anti-Leptospira em soros de equinos no estado do Rio Grande do Sul. **Arq Fac Vet UFRGS**, v. 19, n. 1, p. 9-14, 1991.

AHN, Bo-Eun et al. Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in *Streptomyces coelicolor*. **Molecular microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1848-1858, 2006.

ALEJANDRA, M.R; MATTHIEU, D; OLIVIER, S; HERRMAN, C; CASTRO-MONDRAGON, J. RSAT 2015: **Regulatory Sequence Analysis Tools**. Nucl. Acids Res. 43 (W1): W50-W56

AUSUBEL, Frederick M. et al. Short protocols in molecular biology. 1992.

AVELAR, K. E. S.; PEREIRA, M. M. Espiroquetídeos. **Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia**, v. 4, p. 399-408, 2004.

BALAKRISHNAN, Lekshmy et al. Reversible Transport by the ATP-binding Cassette Multidrug Export Pump LmrA ATP SYNTHESIS AT THE EXPENSE OF DOWNHILL ETHIDIUM UPTAKE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 12, p. 11273-11280, 2004.

BAROCCHI, Michele A. et al. Identification of New Repetitive Element in *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni and Its Application to PCR-Based Differentiation of *Leptospira* Serogroups. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 191-195, 2001.

BARBOSA, M. Aglutininas e lisinas antileptospira em soros de bovinos, equinos e suínos em Minas Gerais. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, 1962, 14, 1, v. 26, 1962.

BLENCOWE, Dayle K.; MORBY, Andrew P. Zn (II) metabolism in prokaryotes. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 291-311, 2003.

BHARTI, Ajay R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

**BRASIL. Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – v. único– Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRAZ, Vânia S. et al. CztR, a LysR-type transcriptional regulator involved in zinc homeostasis and oxidative stress defense in *Caulobacter crescentus*. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 20, p. 5480-5488, 2010

BROCKLEHURST, Kathryn R. et al. ZntR is a Zn (II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 31, n. 3, p. 893-902, 1999.

CORDEIRO, Fernando; DE ALMEIDA RAMOS, Auvanir; JÚNIOR, João Alves Batista. Aglutininas antileptospira em soros de equinos de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 9, n. 7, p. 45-48, 1974.

CORRÊA, Marcelo OA et al. Leptospiroses em equinos: inquérito sorológico. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 15, n. 1-2, p. 186-193, 1955.

CHAVES, Gustavo Antonio Teixeira. **Captação de ferro e efeito desse metal para crescimento e morfologia de *Xylella fastidiosa***. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CHEN, Jue. Molecular mechanism of the *Escherichia coli* maltose transporter. **Current opinion in structural biology**, v. 23, n. 4, p. 492-498, 2013.

DAWSON, Roger JP; LOCHER, Kaspar P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. **Nature**, v. 443, n. 7108, p. 180, 2006.

DEAN, Michael; HAMON, Yannick; CHIMINI, Giovanna. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Journal of lipid research**, v. 42, n. 7, p. 1007-1017, 2001.



DESROSIERS, Daniel C. et al. Znu is the predominant zinc importer in *Yersinia pestis* during in vitro growth but is not essential for virulence. **Infection and immunity**, v. 78, n. 12, p. 5163-5177, 2010.

ELLISON, Matthew L. et al. The transcriptional regulator Np20 is the zinc uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75389, 2013.

FAINE, S. et al. *Leptospira* and leptospirosis. 1999. **Melbourne, Australia: MediSci**, v. 2.

FREITAS, DC de et al. Notas sobre leptospirose equina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 27, p. 93-6, 1960.

GABALLA, Ahmed; HELMANN, John D. Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 22, p. 5815-5821, 1998.

GABRIEL, Scott E.; HELMANN, John D. Contributions of Zur-controlled ribosomal proteins to growth under zinc starvation conditions. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 19, p. 6116-6122, 2009.

GIORGI, W. et al. Leptospirose em equinos: inquérito sorológico e isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* de feto abortado. **Biológico**, 1981.

GOUVEIA, Edilane L. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 3, p. 505, 2008.

HANAHAHAN, Douglas. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of molecular biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HANKE, K. (2005). **Bacterial zinc uptake and regulators**. **Curr. Opin. Microbiol.** 8, 196–202.

HANTKE, Klaus. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 182, n. 2, p. 288-292, 1981.

HOLLAND, I. Barry; BLIGHT, Mark A. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. **Journal of molecular biology**, v. 293, n. 2, p. 381-399, 1999.

JARDIM, Eduardo Cavaleiro et al. Aglutininas antileptóspira em equinos no estado de Goiás. 1978.

JOHNSON, Russell C.; HARRIS, Virginia G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires I. Growth at low temperatures. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 1, p. 27-31, 1967.

KIVISTIK, Paula A. et al. Identification of ColR binding consensus and prediction of regulon of ColRS two-component system. **BMC molecular biology**, v. 10, n. 1, p. 46, 2009.

KO, A. I. et al. Salvador Leptospirosis Study Group Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820-5, 1999.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LEHMANN, Jason S. et al. Leptospiral pathogenomics. **Pathogens**, v. 3, n. 2, p. 280-308, 2014.

LI, Yingli et al. Characterization of Zur-dependent genes and direct Zur targets in *Yersinia pestis*. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 128, 2009.

LO, Miranda et al. Transcriptional response of *Leptospira interrogans* to iron limitation and characterization of a PerR homolog. **Infection and immunity**, v. 78, n. 11, p. 4850-4859, 2010.

KURODA, Makoto; HAYASHI, Hideo; OHTA, Toshiko. Chromosome-determined zinc-responsible operon *czt* in *Staphylococcus aureus* strain 912. **Microbiology and immunology**, v. 43, n. 2, p. 115-125, 1999.

MA, Zhen; JACOBSEN, Faith E.; GIEDROC, David P. Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. **Chemical reviews**, v. 109, n. 10, p. 4644-4681, 2009.

MACIĄG, Anna et al. Global analysis of the Mycobacterium tuberculosis Zur (FurB) regulon. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 730-740, 2007.

MARET, Wolfgang; LI, Yuan. Coordination dynamics of zinc in proteins. **Chemical reviews**, v. 109, n. 10, p. 4682-4707, 2009.

MAZZON, Ricardo Ruiz et al. Analysis of the *Caulobacter crescentus* Zur regulon reveals novel insights in zinc acquisition by TonB-dependent outer membrane proteins. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 734, 2014.

MOLNAR, E.; DIAS, H. L. T.; MOLNAR, L. **Estudo comparativo entre o teste da soroaglutinação microscópica (SAM) e o imunoensaio ligado à enzima (ELISA) para o diagnóstico da leptospirose equina**. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 151-155, 2001.

MOHAMMED, Haraji et al. Leptospira: morphology, classification and pathogenesis. **J Bacteriol Parasitol**, v. 2, n. 06, 2011.

MOMO, Leonardo Hiroyuki Santos. **Caracterização da família de reguladores de absorção de metais e resposta a estresse em *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

NASCIMENTO, A. L. T. O. et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164-2172, 2004.

NOINAJ, Nicholas et al. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. **Annual review of microbiology**, v. 64, p. 43-60, 2010.

OLDHAM, Michael L.; CHEN, Jue. Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15152-15156, 2011.

PAWLIK, Marie-Christin et al. The zinc-responsive regulon of *Neisseria meningitidis* comprises 17 genes under control of a Zur element. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 23, p. 6594-6603, 2012.

PATZER, Silke I.; HANTKE, Klaus. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator zur in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1199-1210, 1998.

PEDERSEN, Peter L. Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 39, n. 5-6, p. 349-355, 2007.

PORCHERON, Gaëlle et al. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. **Metal Economy in Host-Microbe Interactions**, 2015.

PRESTEL, Eric; NOIROT, Philippe; AUGER, Sandrine. Genome-wide identification of *Bacillus subtilis* Zur-binding sites associated with a Zur box expands its known regulatory network. **BMC microbiology**, v. 15, n. 1, p. 13, 2015.

KO, Albert I.; GOARANT, Cyrille; PICARDEAU, Mathieu. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736, 2009.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. Molecular cloning: a laboratory manual. 2001. 2001.

SANGER, Frederick; NICKLEN, Steven; COULSON, Alan R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTA ROSA, C. A. et al. Leptospirose em equinos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 35, p. 61-5, 1968.

SILVA, A. S. et al. Pesquisa de aglutininas antileptospira em soros de equinos. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 2, n. 8, p. 196-205, 1972.

STORK, Michiel et al. An outer membrane receptor of *Neisseria meningitidis* involved in zinc acquisition with vaccine potential. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 7, p. e1000969, 2010.

STUDIER, F. William et al. [6] Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1990. p. 60-89.

TANG, Dong-Jie et al. The zinc uptake regulator Zur is essential for the full virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 18, n. 7, p. 652-658, 2005.

TOMII, Kentaro; KANEHISA, Minoru. A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. **Genome research**, v. 8, n. 10, p. 1048-1059, 1998.

TERUYA, J. M. et al. Soro-aglutinações para leptospirose realizadas no Instituto Biológico de São Paulo, durante o ano de 1973. **Biologico**, 1974.

YANG, Xinghong et al. Deletion of *znuA* virulence factor attenuates *Brucella abortus* and confers protection against wild-type challenge. **Infection and immunity**, v. 74, n. 7, p. 3874-3879, 2006

WANG, Da; FIERKE, Carol A. The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in *E. coli*. **Metallomics**, v. 5, n. 4, p. 372-383, 2013

WILKENS, Stephan. Structure and mechanism of ABC transporters. **F1000prime reports**, v. 7, 2015.